

**UNIVERSIDAD CATÓLICA SANTO TORIBIO DE MOGROVEJO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE ODONTOLOGÍA**



**Efecto de tres enjuagues orales comerciales sobre la adherencia de un modelo de biofilm *in vitro* de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus gordonii***

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
CIRUJANO DENTISTA**

**AUTOR**

**Valeria Teresa Diaz Cabrera**

**ASESOR**

**Mariano Wenceslao Ortiz Pizarro**  
<https://orcid.org/0000-0002-3472-9997>

**Chiclayo, 2023**

**Efecto de tres enjuagues orales comerciales sobre la adherencia de un modelo de biofilm *in vitro* de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus gordonii***

PRESENTADA POR

**Valeria Teresa Diaz Cabrera**

A la Facultad de Medicina de la  
Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo  
para optar el título de

**CIRUJANO DENTISTA**

APROBADA POR

Alfredo Carlos Rendon Alvarado  
PRESIDENTE

Carmen Lizeth Diaz Silva  
SECRETARIO

Mariano Wenceslao Ortiz Pizarro  
VOCAL

## **Dedicatoria**

A mis padres Mario Díaz y Yolanda Cabrera por todo su apoyo en estos años de formación universitaria.

## **Agradecimientos**

A Dios padre y la Virgen María que han guiado mis pasos para permitirme llegar hasta aquí.  
Además, agradecer a mis asesores el Dr. Mariano Ortiz y el Dr. Pablo Millones Gómez por su compromiso y apoyo con mi proyecto desde un inicio.

## INFORME FINAL DE TESIS - VALERIA DIAZ

### ORIGINALITY REPORT

|                  |                  |              |                |
|------------------|------------------|--------------|----------------|
| <b>15%</b>       | <b>15%</b>       | <b>0%</b>    | <b>2%</b>      |
| SIMILARITY INDEX | INTERNET SOURCES | PUBLICATIONS | STUDENT PAPERS |

### PRIMARY SOURCES

|          |   |               |
|----------|---|---------------|
| <b>1</b> | <b>repositorio.upch.edu.pe</b><br>Internet Source | <b>8%</b>     |
| <b>2</b> | <b>repositorio.uss.edu.pe</b><br>Internet Source  | <b>2%</b>     |
| <b>3</b> | <b>core.ac.uk</b><br>Internet Source              | <b>1%</b>     |
| <b>4</b> | <b>repositorio.ucv.edu.pe</b><br>Internet Source  | <b>1%</b>     |
| <b>5</b> | <b>www.scielo.edu.uy</b><br>Internet Source       | <b>&lt;1%</b> |
| <b>6</b> | <b>cybertesis.unmsm.edu.pe</b><br>Internet Source | <b>&lt;1%</b> |
| <b>7</b> | <b>tesis.usat.edu.pe</b>                          | <b>&lt;1%</b> |

## Índice

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| <b>Resumen .....</b>                | <b>6</b>  |
| <b>Abstract .....</b>               | <b>7</b>  |
| <b>Introducción.....</b>            | <b>8</b>  |
| <b>Revisión de literatura .....</b> | <b>8</b>  |
| <b>Resultados y discusión .....</b> | <b>15</b> |
| <b>Conclusiones .....</b>           | <b>22</b> |
| <b>Recomendaciones.....</b>         | <b>22</b> |
| <b>Referencias.....</b>             | <b>23</b> |
| <b>Anexos.....</b>                  | <b>27</b> |

## Resumen

El objetivo fue evaluar el efecto de tres enjuagues orales comerciales sobre la adherencia bacteriana de un modelo de biofilm *invitro* de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus gordonii*. Los enjuagues orales empleados fueron Colgate Periogard, Vitis Orthodontic y Listerine Anti-Sarro Zero Alcohol, como control positivo se empleó clorhexidina a 0.12% y como control negativo la solución salina al 0.9 %. Para la prueba de sensibilidad del efecto antibacteriano en cepas de (*S.mutans* y *S.gordonii*, primero se aplicó el método Kirby-Bauer con discos de difusión de los enjuagues en agar Brain Heart Infusion en cada placa con sus respectivos discos de control (positivo y negativo) en un tiempo de 24 horas. Se determinó la adherencia mediante la lectura de absorbancia con la ayuda de un espectrofotómetro, mediante 3 ciclos de lavado por 10 segundos a temperaturas de 25-30°C con solución PBS-1X mantenido un pH 7 evaluados en 24 y 72 horas, así mismo se corroboró la presencia de ambos microorganismos a través de una prueba de PCR. Respecto al efecto antibacteriano de los tres enjugues, el enjuague bucal Colgate Periogard presentó mayor efecto antimicrobiano en *S. mutans* y *S.gordonii* con un promedio de (42.97 mm) y (41.25 mm) respectivamente de diámetro en comparación al Vitis Orthodontic (15.27 mm) y (14.73mm) respectivamente y Listerine Anti-Sarro Zero alcohol (0.00) en ambas cepas. Respecto el efecto antiadherente de los tres enjugues a las 24 y 72 horas, se encontró que los enjuagues Colgate Periogard y Vitis Orthodontic obtuvieron valores de absorbancia significativamente menores que el Listerine Anti-Sarro Zero, lo cual indica que ambos enjuagues tienen efecto antiadherente. Acerca de la prueba de Dunnet, se encontró que no hubo diferencias entre las absorbancias del enjuague Colgate Periogard y la clorhexidina 0.12%. Se concluye que de los tres enjuagues evaluados el Colgate Periogard obtuvo efectos antimicrobianos superiores a comparación de los enjuagues Vitis Orthodontic y Listerine Anti-Sarro Zero alcohol. Respecto al efecto antiadherente de los enjuagues evaluados, el Colgate Periogard y Vitis Orthodontic tuvieron resultados antiadherentes estadísticamente similares y superiores al Listerine Anti-Sarro Zero alcohol.

**Palabras clave:** Antisépticos Bucales, Adhesión Bacteriana, Biopelículas, Técnicas In Vitro (DeCS).

## Abstract

Background: To evaluate *in vitro* the effect of three commercial oral rinses on bacterial adherence of an invitro biofilm model of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus gordonii*.

Materials and methods: Colgate Periogard, Vitis Orthodontic and Listerine Anti-Tartar Zero Alcohol rinses were used, the positive control was with 0.12% chlorhexidine and the negative control with 0.9% saline solution. For the sensitivity test of the antibacterial effect in strains of (*S.mutans* and *S.gordonii*) the Kirby-Bauer method was applied with diffusion discs of the Brain Heart Infusion agar rinses in each plate with control discs (positive and negative). ) for 24 hours; adherence was determined by reading absorbance with the help of a spectrophotometer, through 3 washing cycles for 10 seconds at temperatures of 25-30°C with PBS-1X solution, pH 7, with evaluations at 24 and 72 hours. the presence of both microorganisms was confirmed with a PCR test.

Results: In the antibacterial effect, Colgate® Periogard presented a greater antimicrobial effect on *S.mutans* and *S.gordonii* with an average of (42.97mm) and (41.25mm) respectively in diameter compared to Vitis® Orthodontic (15.27mm) and (14.73mm). ) respectively and Listerine Anti-Tartar Zero alcohol (0.00) in both strains. Colgate® Periogard and Vitis® Orthodontic rinses have an antihedring effect, they obtained significantly lower absorbance values than Listerine® Anti-Tartar Zero at 24 and 72 hours. In Dunnet's test, there were no differences between the absorbances of Colgate® Periogard rinse and chlorhexidine 0.12%.

Conclusions: Colgate® Periogard obtained superior antimicrobial effects compared to the other rinses, Colgate® Periogard and Vitis® Orthodontic had statistically similar and superior antihypertensive results to Listerine® Anti-Tartar Zero alcohol.

Keywords: *Oral Antiseptics, Bacterial Adhesion, Biofilms, In Vitro Techniques.*

## Introducción

Existe literatura bien documentada con respecto a la asociación entre el aumento de la incidencia de caries, la morfología y arquitectura de los brackets, debido a la formación de nuevas áreas de retención para la biopelícula dental <sup>(1)</sup>. Los aparatos ortodónticos pueden causar variaciones específicas en la microflora bucal al disminuir el pH, por ende, aumentando la acumulación de placa dental y el recuento microbiano en la saliva <sup>(2)</sup>, lo cual ha generado la necesidad de utilizar agentes coadyuvantes para su control <sup>(3)</sup>.

Es importante evaluar el uso de los enjuagues orales que se prescriben en ortodoncia, ya que se introdujeron como un método eficaz para reducir la acumulación de placa dental, los ortodoncistas consideran que el flúor es un factor de influencia en la recomendación de enjuagues bucales durante el tratamiento de ortodoncia, para prevenir las manchas blancas y lesiones de caries dentales, además de otros agentes químicos como la aceites esenciales <sup>(4)</sup>, clorhexidina <sup>(5)</sup> y cloruro de cetilpiridinio <sup>(6)</sup>.

Por otro lado, existe evidencia que ha demostrado un aumento de los niveles de *Streptococcus mutans* (spp. mutans) debido al uso de aparatos de ortodoncia, así como se ha descrito la presencia de *Streptococcus gordonii* (spp. gordonii) en lesiones de mancha blanca, revelando un posible rol en la desmineralización del esmalte <sup>(7,8)</sup> y provoca la formación de manchas blancas alrededor de los brackets <sup>(9, 10)</sup>.

Entonces, el objetivo principal de este estudio fue evaluar el efecto de tres enjuagues orales comerciales sobre la adherencia bacteriana de un modelo de biofilm in vitro de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus gordonii*.

## Revisión de literatura

Estudios han reportado que los enjuagues bucales que contienen clorhexidina y cetilpiridinio pueden ser efectivos para regular la homeostasis microbiana de la cavidad oral, al proporcionar un balance positivo para la salud bucal, además de reducir el espesor de la biopelícula y destruir bacterias gram-positivas y gram-negativas, actúan eficazmente frente a *S. mutans* y *S. sobrinus*, *S. viridans* en diferentes estudios. Al igual que Listerine y su composición con aceites esenciales se ha estudiado que inhibe la formación de biopelículas y el crecimiento de las bacterias cariogénicas, por lo tanto, se recomiendan sus usos en la práctica clínica <sup>(9,10,11)</sup>.

Usualmente el desarrollo de la caries tarda alrededor de 6 meses, pero las lesiones de mancha blanca en los portadores de aparatología ortodóntica fija se vuelven visibles después de 4 semanas, en este proceso se encuentra involucrado *Streptococcus mutans*, que es una de las principales bacterias acidógenas que se encuentran en la cavidad bucal, provocan caries

dental, desmineralización del esmalte y aumentan su colonización con el uso de tratamiento de ortodoncia, también se incluye a *Streptococcus gordonii*, el cual se considera un colonizador primario de superficies bucales, además se reconoce que aumenta su adherencia en superficies con biopelícula dental, por ende, y también representa un papel en la desmineralización del esmalte y provoca la formación de manchas blancas alrededor de los brackets<sup>(12,13)</sup>.

En ese sentido, ha sido útil el uso de espectrofotómetro para estimar la calidad del ADN aislado y para cuantificar la cantidad de especies bacterianas presentes en el biofilm utilizando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR). Se considera que las pruebas PCR se usan para la identificación de la presencia de bacterias acidógenas en el biofilm y para evaluar las expresiones génicas adaptativas en biopelículas<sup>(14,15,16)</sup>, también es utilizada con mayor satisfacción en microbiología clínica para amplificar con mayor sensibilidad el ADN diana<sup>(12)</sup>. En la espectrofotometría se utiliza un sistema de análisis de imágenes digitales personalizado para evaluar la acumulación y eliminación de especies bacterianas y así encontrar un método de medición alternativo fiable<sup>(17,18,19)</sup>.

Durante el tratamiento de ortodoncia es importante la eliminación mecánica de la placa dental; generalmente se lleva a cabo mediante el uso de pasta dental, no obstante, se recomienda adicionar la desinfección química con el uso de los enjuagues bucales, los cuales reducen el grosor de la placa y alteran la estructura de esta, dejándola más susceptible a la acción de los distintos sistemas de control químico<sup>(20,21)</sup>.

Para ello hay estudios que consideran a la clorhexidina como gold estándar ya que ha sido evaluado frente a bacterias y se obtuvo resultados en los que reduce gran cantidad de *S. Mutans* incluso que mejora el índice gingival en pacientes ortodónticos<sup>(15,16,22)</sup>. Entre los otros enjuagues que optó evaluar está el cloruro de cetilpiridinio (CPC), el cual, actúa frente a bacterias grampositivas, gramnegativas, virus y hongos, similar a la clorhexidina, respecto a su efecto antiadherente realiza una actividad de control y reducción de placa y actúa frente a las toxinas proinflamatorias liberadas por las bacterias, para prevenir la aparición de gingivitis. Respecto a los aceites esenciales, se ha considerado uno de los agentes químicos eficaces como complemento del control mecánico de placa supragingival para el uso diario, no presenta efectos adversos en comparación con clorhexidina, la cual se limita su uso continuo<sup>(23,24,25)</sup>.

## **Materiales y Métodos**

El presente estudio fue aprobado y revisado de forma independiente por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo, mediante resolución de

aprobación N°087-2022-USAT-FMED. El proyecto de investigación es de tipo experimental, prospectivo, transversal y analítico, donde se trabajó con grupos de estudio y unidad de análisis, los grupos de estudio fueron los enjuagues bucales como Vitis Orthodontic® (Dentaid, Cerdanyola, España), Colgate Periogard® (Colgate-Palmolive Co., Nueva York, NY, EE. UU.), Listerine® Anti-Sarro Zero Alcohol (Johnson & Johnson Consumer Inc., Skillman, NJ, USA) (Fig. 1) y los grupos controles positivo y negativo son la Clorhexidina al 0.12% (Dentaid, Barcelona, España) y la solución salina, respectivamente. Y respecto a la unidad de análisis estuvo conformada por el biofilm de *Streptococcus mutans* ATCC 25175<sup>TM</sup> y *Streptococcus gordonii* ATCC 51656<sup>TM</sup>.

Para la estandarización de la metodología de efecto antibacteriano y efecto antiadherente se realizó una prueba piloto.

### **Evaluación del efecto antibacteriano**

Para determinar el efecto antibacteriano de los tres enjuagues. Primero se emplearon bacterias de *Streptococcus gordonii* ATCC 51656 y *Streptococcus mutans* ATCC 25175, usando la prueba de sensibilidad antimicrobiana mediante el método Kirby-Bauer (disco difusión en agar), seguido de la preparación en placas con conteniendo agar de Brain Heart Infusion (BHI), las cuales posteriormente fueron controladas por 24 horas para comprobar la esterilidad. Respecto a la preparación del inóculo, la cepa fue cultivada en caldo cerebro corazón infusión (BHI) por 24 horas y luego se llevó a la escala de Mac Farland de 0,5. En donde el enfrenamiento se realizó embebiendo un hisopo con el inóculo anteriormente preparado, luego se procedió a sembrar en la superficie del agar por cuatro veces, se dejó reposar por 5 minutos para luego proceder a colocar los discos de papel de filtro (whatman 3) de 6 mm de diámetro, impregnados con 10 ul de cada uno de los enjuagues de prueba, por separado (Fig. 2) y (Fig. 3). Este procedimiento fue repetido por 3 veces. Se empleó como control positivo la clorhexidina a 0.12% y como control negativo solución salina. Después fueron incubadas todas las placas con las muestras y controles positivos y negativos a 37 °C por 48 horas, en condiciones de anaerobiosis<sup>(26)</sup>.



Fig. 1: Enjuagues empleados en el estudio

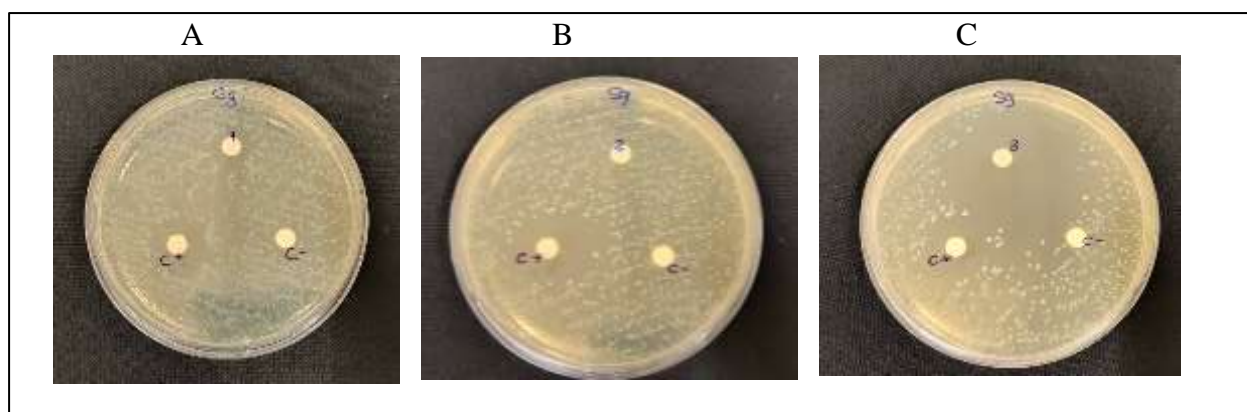


Fig. 2 A to C: Placas de prueba de sensibilidad antimicrobiana con halos de inhibición de 3 enjuagues bucales sobre *Streptococcus gordonii*. (A) **VITIS**. (B) **LISTERINE**. (C) **COLGATE – PERIOGARD** y controles positivo (C+) Clorhexidina 0.12% y control negativo (C-) Solución salina.

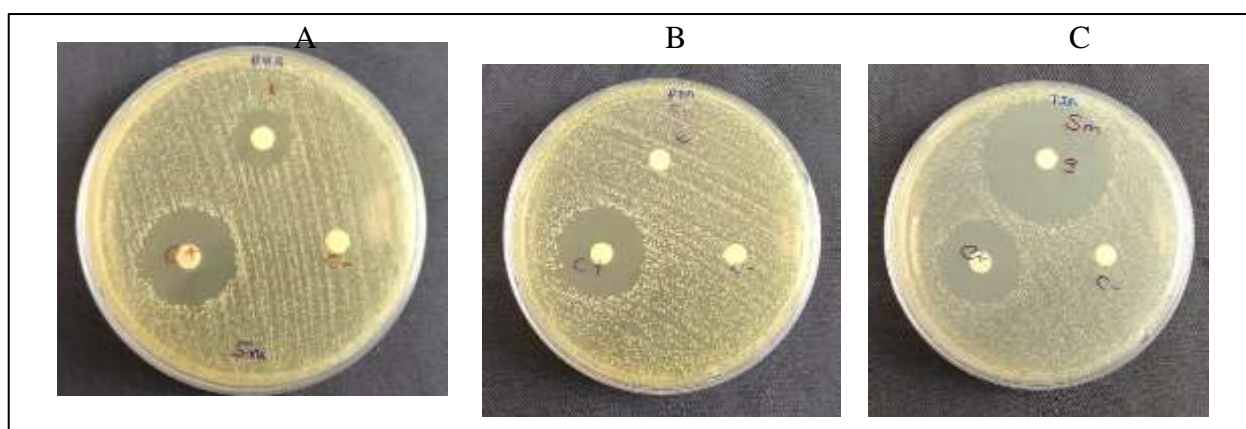


Fig.3 A to C: placas de prueba de sensibilidad antimicrobiana con halos de inhibición de 3 enjuagues bucales sobre *Streptococcus mutans*. (A) **VITIS**. (B) **LISTERINE**.

(C) **COLGATE – PERIOGARD** y controles positivos (C+) Clorhexidina 0.12% y control negativo (C-) Solución salina.

### **Formación de Biofilm de dos especies**

Primero se determinó la vitalidad de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus gordonii*, mediante la prueba de PCR. Luego se cultivaron en Brain Heart Infusion (BHI) suplementado con sacarosa al 2.5%, con 30 g x L de (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la saliva artificial: 350 mL de solución salina (350 mL H<sub>2</sub>O con 3.15 g de NaCl) una solución de carboximetilcelulosa (CMC) (4 gr de carboximetil celulosa en 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y 50 mL de glicerina. El volumen final: 500 mL, autoclavada y conservada a 4°C.

A continuación, se formó el biofilm en la superficie de poliestireno transparente (microplacas de 24 pozos). Se realizó la inoculación de cada cepa por separado en 15 ml de Caldo Soja Trypticaseína (TSB) a 37°C en anaerobiosis hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento de cada una de ellas. *S. gordonii* por el periodo de 4 h y 30 min, *S. mutans* por 3 h a una densidad óptica de 0.125 nm con 150 x 10<sup>6</sup> células/ml. En un mismo tiempo se prepararon las superficies de poliestireno transparente (microplacas de 24 pozos) donde se agregó 300 µl de saliva artificial en cada pozo e incubó a 4°C x 16h. Se retiró la saliva artificial y se hicieron 2 lavados con 300 µl de PBS (1X), se agregó 270 µl de BHI + sacarosa 2.5% y se inoculó 10 µl de *S. gordonii*, 10 µl de *S. mutans*. Finalmente se incubó cada lámina por 24 h a 37°C en condiciones de anaerobiosis <sup>(27)</sup>.

### **PCR para detección de *S. mutans* y *S. gordonii* en muestras de Biofilm**

#### **Preparación de las muestras de biofilm y extracción de ADN**

Con la ayuda de una micropipeta se retiró el medio TSB de cada uno de los compartimentos de las láminas, luego se realizó un primer lavado añadiendo 200 µl de agua de PCR a cada uno de los compartimentos, descartándolo con la ayuda de una micropipeta. Se realizó un segundo lavado, de la misma manera descrita que en el paso previo. Para la extracción de ADN se añadió a cada compartimento 200 µl del buffer de lisis TEN (Tris HCl 1M, EDTA 0.5 M, NaCl 1M y agua de PCR). Se procedió a hacer un raspado utilizando un asa bacteriológica recta para poder desprender la muestra de biofilm de cada compartimento. Se traspasó los 200 µl de buffer TEN incluyendo la muestra desprendida a tubos de microcentrifuga de 1.5 ml. Se añadió 50 µl de lizosima 1X a cada muestra, y se homogenizó en el vortex. Las muestras se incubaron a 37°C

por 30 minutos. Luego, se añadió 50 µl de proteinasa K a cada muestra y se homogenizó en el vortex. Las muestras se incubaron a 37°C por 30 minutos. Se procedió a hacer un hervido de las muestras a 100°C por 10 minutos. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 minutos. Se separó 100 µl del sobrenadante a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y fueron almacenados a -20°C hasta el momento de la prueba<sup>(28)</sup>.

Usando los siguientes primers, se identificó la presencia de *S. mutans* y *gordonii* a las 24 y 72h (Tabla 1 y Tabla 2).

Para la PCR Convencional para la detección de *Streptococcus mutans* se volvieron a suspender los primers según lo indicado por el fabricante hasta obtener una concentración de 100 µM (Tabla 1).

Tabla 1: PCR Convencional para la detección de *Streptococcus mutans*

| Especie   | Primer         | ID     | Secuencia                           |
|-----------|----------------|--------|-------------------------------------|
| S. mutans | Primer forward | GtfB F | 5'-<br>GCCTACAGCTCAGAGATGCTATTCT-3' |
|           | Primer reverse | GtfB R | 5'-<br>GCCATACACCACTCATGAATTGA-3'   |

Tabla 2: PCR en Tiempo Real para la detección de *Streptococcus gordonii*

| Especie     | Primer/ Sonda  | ID            | Secuencia                    | Canal de lectura |
|-------------|----------------|---------------|------------------------------|------------------|
| S. gordonii | Primer forward | GtfG F        | CGGATGATGCTAATCAAGTGACC      |                  |
|             | Primer reverse | GtfG R        | GTTAGCTGTTGGATTGGTTGCC       |                  |
|             | Sonda          | GtfG<br>Probe | AGAACAGTCCGCTGTTCAGAGCA<br>A | Green            |

La primera dosis de los enjuagues fue administrado pasadas las 24 horas de su conformación donde se procedió a retirar cuidadosamente el sobrenadante de cada pozo. Luego se hicieron lavados con 300 µl de Solución Salina Amortiguada por Fosfato PBS (1X) 3 veces. Además, se administró 300 µl de los enjuagues e incubó por 1 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se retiró el enjuague e hicieron lavados a la superficie de cada pozo con 300 µl de PBS (1X) 2 veces. Finalmente se agregó 300 µl de medio de cultivo estéril BHI + SAC. 2.5% y se incubó a 37 °C x 24h en condiciones de anaerobiosis<sup>(11)</sup>. Se conformaron los grupos:

- Grupo 1 (Sm + Sg): 300 µl de enjuague VITIS en cada pozo cada 24h hasta cumplir los tiempos de evaluación 24 horas (tiempo 1), 72 horas (tiempo 2).

- Grupo 2 (Sm + Sg): 300  $\mu$ l de enjuague LISTERINE. en cada pozo cada 24h hasta cumplir los tiempos de evaluación 24 horas (tiempo 1), 72 horas (tiempo 2).

- Grupo 3 (Sm + Sg): 300  $\mu$ l de enjuague COLGATE – PERIOGARD en cada pozo cada 24h hasta cumplir los tiempos de evaluación 24 horas (tiempo 1), 72 horas (tiempo 2).

- Grupo 4 (control negativo): 300  $\mu$ l de solución salina en la superficie de cada pozo cada 24h hasta cumplir los tiempos de evaluación 24 horas (tiempo 1), 72 horas (tiempo 2).

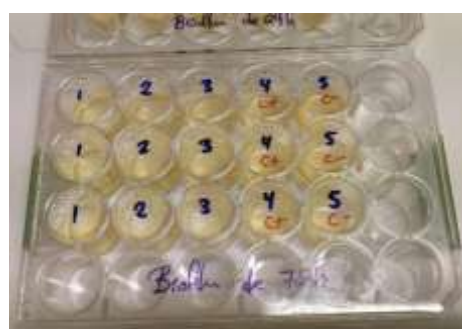
- Grupo 5 (control positivo): 300  $\mu$ l de Clorhexidina al 0.12% en la superficie de cada pozo cada 24h hasta cumplir los tiempos de evaluación 24 horas (tiempo 1), 72 horas (tiempo 2).

### Efecto antiadherente

Mediante la lectura de absorbancia, primero se retiraron las placas de biofilm de la jarra de anaerobiosis cuidadosamente y se eliminó el sobrenadante de cada pozo, sin ejercer mucha fuerza. Continuamente se realizaron lavados a cada pozo con 300 PBS-1X, pH 7.0 (atemperado, 25-30 °C). Estos se realizaron 3 veces durante 10 segundos, con ayuda de una pipeta pasteur (con la finalidad de retirar el medio de cultivo remanente y bacterias no adheridas). Luego se agregó 300  $\mu$ l de tripsina ejerciendo movimientos de vaivén por 5 minutos para realizar el desprendimiento y retirar todas las células adheridas en las superficies del pozo. Finalmente se tomó 100  $\mu$ l el contenido de cada pozo y se colocó en una microplaca de 96 pocillos para hacer la medición de la densidad óptica a 595 nm ( $OD_{595}$ ) en un espectrofotómetro (lectora de microplacas) <sup>(26)</sup>.



A



B

Fig 4 A y B: Biofilms de *S. gordonii* y *Streptococcus mutans* formados en placas de poliestireno a 24h e Imagen B: Biofilms de *S. gordonii* y *Streptococcus mutans* formados en placas de poliestireno a 72h.

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron registrados en una matriz de datos Excel Microsoft y analizados mediante el uso del software estadístico SPSS versión 26.0, utilizando estadística descriptiva y técnicas paramétricas para probar el efecto de los tratamientos (comparación de medias, comparación de varianzas, evaluación de supuestos de homogeneidad de varianzas, comparación de cada grupo con su grupo control y normalidad). Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para establecer si hubo o no diferencias significativas entre los halos de inhibición; es decir, en las variables cuantitativas a comparar y seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, el cual determinó si hubo diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre el efecto de cada enjuague bucal evaluado. Se realizó un análisis paramétrico, prueba de Kolmogorov-Smirnov para observar si hay normalidad de los errores.

## Resultados y discusión

### Efecto antibacteriano

Se realizó la interpretación de los resultados del estudio de acuerdo a los objetivos, donde el primer objetivo específico fue evaluar el efecto antibacteriano de tres enjuagues orales comerciales sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175<sup>TM</sup> y *Streptococcus gordonii* ATCC 51656<sup>TM</sup>. Para ello, se midieron y compararon los diámetros de los halos de inhibición para cada concentración de los enjuagues evaluados. Con respecto a los supuestos, la homocedasticidad evaluada mediante la Prueba de Levene ( $p > 0.05$ ), acepta la igualdad de varianzas ya que en la tabla 3 se muestra un valor  $p > 0.07$  para *S. mutans* y un  $p > 0.12$  para *S. gordonii*. Asimismo, también se cumplió el supuesto de normalidad según el test de Kolmogorov – Smirnov ( $p > 0.05$ ) para *S. mutans* y *S. gordonii*.

La prueba F de ANOVA indica diferencias significativas entre los enjuagues en experimentación y/o controles en la inhibición del crecimiento tanto de *S. gordonii* ( $p < 0.001$ ), como de *S. mutans* ( $p < 0.001$ ). Debido a que se detectaron diferencias significativas en el efecto de los enjuagues, se aplicará la prueba post-hoc de Tukey en donde se comparó la media de los tres enjuagues por pares. Se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas, por lo que en la Tabla 3, se muestran diferentes letras en la columna de los enjuagues. Asimismo, las letras se ordenaron de menor a mayor valor desde la letra a hasta la c. El diámetro de halo de inhibición del Colgate Periogard, fue significativamente superior a los otros enjuagues. También, el diámetro de halo de inhibición de Vitis Orthodontic fue significativamente mayor al de Listerine Anti-Sarro Zero Alcohol.

Con respecto a la prueba de Dunnett, la cual se utilizó para comparar las medias de los grupos experimentales con la media de los grupos de control. Con respecto a la solución salina, los enjuagues mostraron un diámetro de halo de inhibición significativamente mayor, a excepción del Listerine Anti-Sarro Zero Alcohol ( $0.000 \pm 0.000$ ), el cual presentó un valor similar. Mientras que en relación con la clorhexidina al 0.12%, el enjuague bucal Colgate Periogard presentó tanto para *S. mutans* y *gordonii* un diámetro de halo de inhibición significativamente mayor. Sin embargo, Vitis Orthodontic y Listerine Anti-Sarro Zero Alcohol ( $0.000 \pm 0.000$ ), no presentaron diferencias significativas frente a la clorhexidina, tanto para *S. mutans* y *gordonii*.

**Tabla 3:** Sensibilidad antimicrobiana de enjuagues bucales sobre *S. mutans* y *S. gordonii*.

| Enjuague bucal                  | <i>S. mutans</i>       |   |   |                | <i>S. gordonii</i>     |          |   |                |   |       |
|---------------------------------|------------------------|---|---|----------------|------------------------|----------|---|----------------|---|-------|
|                                 | (Diámetro, mm)         |   |   |                | (Diámetro, mm)         |          |   |                |   |       |
|                                 | Media <sup>2,3,4</sup> |   |   | Desv. estándar | Media <sup>2,3,4</sup> |          |   | Desv. estándar |   |       |
| VITIS                           | 15.267                 | b | a | b              | 0.404                  | 14.733   | b | a              | b | 0.493 |
| LISTERINE                       | 0.000                  | a | a | a              | 0.000                  | 0.000    | a | a              | a | 0.000 |
| COLGATE PERIOGARD               | 42.967                 | c | c | b              | 0.709                  | 41.267   | c | c              | b | 1.450 |
| Clorhexidina 0.12%              | 24.433                 |   | b |                | 1.686                  | 18.533   |   | b              |   | 1.193 |
| Solución salina                 | 0.000                  |   |   | a              | 0.000                  | 0.000    |   |                | a | 0.000 |
| Pruebas generales <sup>1</sup>  | 6404.615               |   |   |                | 3.950                  | 1677.290 |   |                |   | 3.133 |
| p                               | 0.000                  |   |   |                | 0.080                  | 0.000    |   |                |   | 0.117 |
| Kolmogorov-Smirnov <sup>5</sup> | 0.213                  |   |   |                |                        | 0.260    |   |                |   |       |
| p                               | 0.200                  |   |   |                |                        | 0.079    |   |                |   |       |

Fuente: Análisis de datos (elaboración propia). Letras similares indican que no hay diferencia significativa. Las letras a, b y c están ordenadas de menor a mayor. <sup>1</sup> ANOVA: F (comparación de medias) y Levene (comparación de varianzas). <sup>2</sup> Prueba de Tukey. <sup>3</sup> Prueba de Dunnett respecto a Clorhexidina 0.12% (bilateral). <sup>4</sup> Prueba de Dunnett respecto a solución salina (unilateral). <sup>5</sup> Prueba de Kolmogorov-Smirnov para normalidad de los errores, con corrección de Lilliefors.

### Efecto antiadherente

El segundo objetivo fue comparar el efecto antiadherente de tres enjuagues comerciales sobre un biofilm oral in vitro de *Streptococcus mutans* ATCC 25175<sup>TM</sup> y *Streptococcus gordonii* ATCC 51656<sup>TM</sup>, mediante absorbancia por espectrofotometría.

Se cumplieron los supuestos de distribución normal según la prueba de Sorghomonov ( $p > 0.05$ ) así como también el de homocedasticidad acorde a la prueba de Levene ( $p > 0.05$ ) tanto para el diámetro del halo de inhibición como para los niveles de absorbancia a las 24 y a las 72

horas. Además, se observó, que la solución salina tenía la mayor absorbancia, ya que esta funciona como el control negativo, y evita que las bacterias se unan a la superficie y estén bacterias flotantes.

La absorbancia de los enjuagues bucales a las 24 horas mostró diferencias según la prueba ANOVA ( $p < 0.001$ ). Según la prueba de Tukey, los enjuagues bucales Colgate Periogard y Vitis Orthodontic, obtuvieron valores de absorbancia significativamente menores a Listerine Anti-Sarro Zero Alcohol, lo cual indica que poseen mayor antiadherencia que el Listerine Anti-Sarro Zero Alcohol. Igualmente, no hubo diferencias significativas entre los enjuagues bucales Colgate Periogard y Vitis Orthodontic por lo que presentaron la misma letra "a". Se encontraron diferencias significativas entre la absorbancia de los enjuagues bucales a las 72 horas mediante la prueba ANOVA. La absorbancia de los enjuagues bucales a las 72 horas mostró diferencias según la prueba F ( $p = 0.002$ ), además se muestra la misma letra "a" para Colgate Periogard ( $0.254 \pm 0.103$ ) y Vitis Orthodontic ( $0.621 \pm 0.073$ ), lo cual indica que siguen siendo mejores comparados con Listerine Anti-Sarro Zero Alcohol ( $1.527 \pm 0.390$ ), según la prueba de Tukey (Tabla 4).

Acerca de la prueba de Dunnet, se encontró que no hubo diferencias entre las absorbancias del enjuague Colgate Periogard y la clorhexidina 0.12%. Por otro lado, los enjuagues bucales Vitis Orthodontic y Listerine Anti-Sarro Zero Alcohol presentaron una absorbancia significativamente superior al de la clorhexidina, es decir, una menor antiadherencia que la clorhexidina. En relación con la solución salina, los enjuagues bucales Vitis Orthodontic y Colgate Periogard mostraron un valor de absorbancia significativamente inferior a la solución salina, es decir, un mayor nivel de antiadherencia que la solución salina. Mientras que, los niveles de absorbancia para el enjuague bucal Listerine Anti-Sarro Zero Alcohol fueron similares a los de la solución salina. La clorhexidina fue la sustancia con menor valor numérico de absorbancia entonces, tuvo un mayor nivel de efecto antiadherente, y no presentó una diferencia significativa con el enjuague bucal Colgate Periogard.

**Tabla 4.** Efecto antiadherente de 3 enjuagues bucales medidos por absorbancia sobre DO 595nm del pellet removido.

| Enjuague bucal                  | 24 horas               |   |   |   | Desv. estándar | 72 horas               |   |   |   | Desv. estándar |
|---------------------------------|------------------------|---|---|---|----------------|------------------------|---|---|---|----------------|
|                                 | Media <sup>2,3,4</sup> |   |   |   |                | Media <sup>2,3,4</sup> |   |   |   |                |
| VITIS                           | 0.590                  | a | b | a | 0.069          | 0.621                  | a | b | a | 0.073          |
| LISTERINE                       | 1.220                  | b | b | b | 0.174          | 1.527                  | b | b | b | 0.390          |
| COLGATE PERIOGARD               | 0.338                  | a | a | a | 0.104          | 0.254                  | a | a | a | 0.103          |
| Clorhexidina 0.12%              | 0.197                  |   | a |   | 0.049          | 0.120                  |   | a |   | 0.069          |
| Solución salina                 | 1.325                  |   |   | b | 0.056          | 1.758                  |   |   | b | 0.081          |
| Pruebas generales <sup>1</sup>  | 40.640                 |   |   |   | 1.710          | 22.959                 |   |   |   | 3.108          |
| P                               | 0.000                  |   |   |   | 0.258          | 0.002                  |   |   |   | 0.119          |
| Kolmogorov-Smirnov <sup>5</sup> | 0.185                  |   |   |   |                | 0.226                  |   |   |   |                |
| P                               | 0.200                  |   |   |   |                | 0.200                  |   |   |   |                |

Fuente: Análisis de datos (elaboración propia) Letras similares indican que no hay diferencia significativa. Las letras a, b y c están ordenadas de menor a mayor. <sup>1</sup> ANOVA: F(comparación de medias) y Levene (comparación de varianzas). <sup>2</sup> Prueba de Tukey. <sup>3</sup> Prueba de Dunnett respecto a Clorhexidina 0.12% (bilateral). <sup>4</sup> Prueba de Dunnett respecto a solución salina (unilateral). <sup>5</sup> Prueba de Kolmogorov-Smirnov para normalidad de los errores, con corrección de Lilliefors

Se debe considerar que las lesiones de mancha blanca en los portadores de aparatología ortodóntica fija son muy frecuentes<sup>(1,2)</sup>, debido a la dificultad que se tiene al realizar la limpieza dental. Se observa una desmineralización del esmalte por la formación y acumulación de placa dental y colonización de microorganismos alrededor del bracket<sup>(12)</sup>. En este proceso se encuentran involucradas dos bacterias acidógenas: *Streptococcus mutans* y *Streptococcus gordonii*, los cuales están relacionados a la presencia de mancha blanca<sup>(4,20)</sup>. Se ha reportado que *Streptococcus mutans* aumenta su colonización con el uso de tratamiento ortodóntico, mientras que *Streptococcus gordonii* se considera un colonizador primario, ya que aumenta su adherencia en superficies con biopelícula dental<sup>(12,13)</sup>. La desinfección química reduce el grosor de la placa y altera la estructura de la misma, dejándola más susceptible a la acción de los distintos sistemas de control mecánico<sup>(10,11)</sup>. En este sentido, se propuso evaluar el efecto antibacteriano y el efecto antiadherente de enjuagues orales generalmente utilizados en el control químico de la placa bacteriana en el tratamiento de ortodoncia.

En la presente investigación se evaluó a los enjuagues Colgate Periogard, Vitis Orthodontic y Listerine Anti-Sarro Zero Alcohol, de los cuales Colgate Periogard destacó por su excelente efecto antibacteriano y antiadherente, debido a que no se encontró diferencias con la clorhexidina al 0.12%, considerado como el gold estándar<sup>(15,22)</sup>. Asimismo, Colgate Periogard también logró destacar sobre los otros enjuagues evaluados, sobre todo frente al Listerine Anti-Sarro Zero Alcohol que obtuvo los valores menos favorables con respecto al efecto antibacteriano y antiadherente del biofilm.

Acero C. et al. reporta que, el cloruro de cetilpiridinio (CPC), como componente del enjuague oral Vitis Orthodontic, es considerado un agente tenso-activo antimicrobiano que tiene un mecanismo de acción favorable para la permeabilidad de la pared bacteriana y afecta irreversiblemente la capacidad de adhesión bacteriana hacia la superficie dentaria en un 35%. Se ha demostrado que el CPC tiene una eficacia moderada y se elimina rápidamente de las superficies bucales, actuando frente a bacterias grampositivas, gramnegativas, virus y hongos, similar a la clorhexidina<sup>(29)</sup>. Sin embargo, en este estudio se corroboró que Vitis Orthodontic con CPC al 0,07 %, sí presenta un buen efecto antibacteriano y antiadherente, pero en menor proporción que Colgate Periogard, ya que a pesar de tener entre sus componentes al CPC 0,05% y fluoruro de sodio 0,33% (NaF), se creía que el fluoruro de sodio podría favorecer a aumentar su efecto antibacteriano. Sin embargo, Araujo I et al. mencionan que el fluoruro de sodio combinado con CPC 0,05% no obtuvo el potencial deseado en la eficacia antimicrobiana, a comparación de usar sólo CPC<sup>(30)</sup>.

Listerine ha sido considerado uno de los agentes químicos con mayor eficacia en el complemento del control mecánico para el uso diario, ya que no presenta efectos adversos en comparación con la clorhexidina. No obstante, Moein N. et al. menciona que los enjuagues bucales que contienen clorhexidina son más efectivos que los enjuagues con aceites esenciales, como es el caso de Listerine <sup>(31)</sup>. Al respecto, Da Silva N. et al. concluyen que los aceites esenciales no presentaron actividad antimicrobiana con *S. Salivarius*, *S. oralis*, *L. casei* y *S. Mutans* a comparación de otros enjuagues con clorhexidina <sup>(32)</sup>. Haerian A. et al. mencionan que el principal componente antibacteriano de Listerine pierde su eficacia en un tiempo relativamente más corto que clorhexidina <sup>(33)</sup> y Chen Y. et al. refieren que Listerine no mostró diferencias en comparación con la solución salina <sup>(34)</sup>. Estos hallazgos confirman los resultados del presente estudio, debido a que Listerine Anti-Sarro Zero Alcohol no presentó resultados favorables en el efecto antibacteriano y efecto antiadherente de las bacterias de *S. mutans* y *S. gordinii*. En este sentido, Araujo I. et al. afirman que la eficacia antibacteriana del Listerine se aumenta con la presencia de fluoruro de sodio, detergente tensoactivo (laurilsulfato de sodio) y peróxido de hidrógeno. Lo anterior puede explicarse debido a que laurilsulfato de sodio y el peróxido de hidrógeno son surfactantes y desinfectantes, con un efecto inhibitorio potencial sobre los estreptococos orales. Además del sinergismo que presenta el fluoruro de sodio a 226 ppm combinado con aceites esenciales <sup>(30)</sup>.

Barbosa I. et al. encontraron que el enjuague Colgate Periogard con clorhexidina al 0.12%, resultó ser efectivo frente a *S. Mutans*, *S.Sanguinis* y *E.coli*. Además, observaron que Colgate Periogard tenía tanta actividad antibacteriana similar a la clorhexidina 1% y era significativamente más activo que clorhexidina 0,12% <sup>(35)</sup>. En la misma línea, Da Silva N. et al. refieren que Colgate Periogard presentó actividad antimicrobiana en otros microorganismos como *S. Salivarius*, *S. oralis*, *L.casei* y *S. Mutans*, en donde se redujo el crecimiento bacteriano de 6.25% a 1.56% <sup>(32)</sup>. Estos resultados coinciden con lo reportado con la presente investigación, en donde se encontró una diferencia significativa de la eficacia de Colgate Periogard frente a los otros enjuagues en las cepas de *S. mutans* y *S. gordinii*. Este efecto aumentado en la actividad antimicrobiana puede explicarse debido a la presencia de agregados como mentol, mentona, isomentol, acetato de mentilo, trans-anetol y eugenorobiana; ya que estos terpenos/fenilpropanoides han demostrado actividad antimicrobiana previamente en otros estudios <sup>(32)</sup>. Colgate Periogard destaca su eficacia en este estudio ya que está relacionado con el ingrediente activo antimicrobiano y sus concentraciones en cada producto probado, como en el estudio de Araujo I. et al. que menciona a la clorhexidina 0.12%, como una molécula catiónica, capaz de unirse de forma no específica a los fosfolípidos de membrana de los

microorganismos. También se menciona su eficacia clínica para reducir la formación de biopelículas y destacar frente a otros enjuagues bucales en la inhibición del crecimiento bacteriano, incluso con una dilución adicionada que sigue siendo eficaz en comparación al Vitis Orthodontic<sup>(30)</sup>.

El conocimiento de las biopelículas salivales proporciona una mejor comprensión de la adherencia microbiana, se optó por realizar las pruebas de adherencia mediante espectrofotometría para estimar la calidad del ADN aislado, incluyendo la prueba PCR para cuantificar la cantidad de especies bacterianas presentes en el biofilm<sup>(28)</sup>. Según Tahmourespour A, et al. se considera que las pruebas PCR se usan para la identificación de la presencia de bacterias acidógenas en el biofilm y para evaluar las expresiones génicas adaptativas en biopelículas, además de ayudar a identificar la presencia de un determinado tipo de bacteria presente en el biofilm, su desarrollo o muerte<sup>(36)</sup>. En este caso del presente estudio, la técnica fue usada para reconocer si es *Spp. mutans* y/o *gordonii*. y así observar que enjuague tuvo el mejor efecto antiadherente, frente a dichas bacterias.

Millones P. et al. y Nafarrete R. et al. reportaron que midieron la adherencia mediante la absorbancia por espectrofotometría, donde se evaluó mediante tiempos, para llegar a obtener el resultado de cuál de los enjuagues tiene valores numéricos más bajos y presenta el mejor efecto antiadherente<sup>(26,28)</sup>. Nafarrete R. et al. realizó el desprendimiento de bacterias con ultrasonido, mientras que en el presente estudio, se realizó usando Tripsina<sup>(28)</sup>; en la presente interpretación de resultados se pudo ver quien tiene valores numéricos más bajos, fue la clorhexidina, ya que evitó la adherencia y es quien tuvo mejor efecto antiadherente, quizás sea debido a que la clorhexidina desprendió las bacterias y con ello, quedaron pocas bacterias, por lo tanto, la absorbancia medida en el espectrofotómetro tuvo niveles más bajos. Y la solución salina, presentó valores más altos, por ende, no evitó la adherencia, con lo que se indicó que es la máxima adherencia y permite que las bacterias se unan en la superficie y esten bacterias flotantes. En el presente estudio la evaluación del efecto antibacteriano, fue en un solo tiempo de 24h, mientras que la del efecto antiadherente fue en dos tiempos de 24 y 72h, ya que el biofilm a las 72h es más maduro, se presentan múltiples especies y tienen matriz polimérica extracelular que los hace muy resistentes. Sin embargo, en los resultados del modelo invitro no hubo variación de ello, si bien es cierto hay una variación numérica, se mantiene a las 24 y 72h el mismo efecto estadísticamente.

Después de los resultados obtenidos, se rescata la eficacia antibacteriana de Colgate Periogard, quien destaca por su componente de Tripolifosfato de Sodio, el cual ayuda a prevenir las manchas causadas por la clorhexidina al 0.12%, pero a la vez no reduce su efecto antibacteriano

y sigue actuando de forma eficaz frente a bacterias de *S. mutans* y *S. gordonii*. Lo anterior, permite afirmar que Colgate Periogard contribuye a la reducción del biofilm de bacterias frecuentemente presentes en la cavidad oral de pacientes bajo tratamiento de ortodoncia, con la ventaja de producir menor decoloración en comparación con clorhexidina.

Dentro de las limitaciones se puede mencionar que, en la metodología se había tomado en cuenta aplicar la concentración mínima inhibitoria (MIC) pero luego se optó por no considerarla ya que la MIC, solo es aplicable en productos no comerciales y respecto a los hallazgos obtenidos, se realizaron en un entorno in vitro y pueden haber alterado su relevancia en una situación clínica; por ello, se debería evaluar su eficacia en futuras investigaciones durante diferentes períodos de tiempo o en prácticas de higiene bucal dentro del tratamiento de ortodoncia para comprender mejor la respuesta microbiológica.

### **Conclusiones**

A pesar de las limitaciones, el presente estudio invitro logró evaluar a diferentes enjuagues usados frecuentemente dentro del control químico de la placa en pacientes con tratamiento de ortodoncia. Colgate Periogard tuvo el mayor efecto antibacteriano y efecto antiadherente frente a *Streptococcus mutans* y *Streptococcus gordonii*, seguido de Vitis Orthodontic. Listerine Anti-Sarro Zero Alcohol presentó los valores menos favorables con respecto a las variables evaluadas.

### **Recomendaciones**

Realizar más estudios clínicos de la eficacia de los enjuagues bucales no solo frente a bacterias frecuentes en cavidad oral, sino también estudios epidemiológicos con hongos o virus que llegan a producir diferentes enfermedades en boca.

Considerar realizar más estudios de aceites esenciales con otro grupo de bacterias frecuentes relacionadas a la cavidad oral.

## Referencias

1. Al-Bazi SM, Abbassy MA, Bakry AS, Merdad LA, Hassan AH. Effects of chlorhexidine (gel) application on bacterial levels and orthodontic brackets during orthodontic treatment. *J Oral Sci.* 2016;58(1):35-42.
2. Vivek Aithal PR, Akshai Shetty KR, Dinesh MR, Amarnath BC, Prashanth CS, Roopak MD. In vitro evaluation of microbial contamination and the disinfecting efficacy of chlorhexidine on orthodontic brackets. *Prog Orthod.* 2019;20(1):17.
3. Nelson-Filho P, Valdez RM, Andruccioli MC, Saraiva MC, Feres M, Sorgi CA, et al. Gram-negative periodontal pathogens and bacterial endotoxin in metallic orthodontic brackets with or without an antimicrobial agent: an in-vivo study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;140(6):e281-7.
4. Soto DL, Lozano AS, Alanis HF, Cepetillo GR, Torres EG, Nakagoshi SE, et al. Streptococcus: An orthodontic point of view. *Int J Appl Dent Sci.* 2021;7(3):237-41.
5. Sanchez-Tito MA, Tay Chu Jon LY. Lesiones de mancha blanca en pacientes con tratamiento de ortodoncia. *Rev. Estomatol. Herediana.* 2021;31(1):44-52.
6. Takenaka S, Ohsumi T, Noiri Y. Evidence-based strategy for dental biofilms: Current evidence of mouthwashes on dental biofilm and gingivitis. *Jpn Dent Sci Rev.* 2019;55(1):33-40.
7. Alshehri FA. The use of mouthwash containing essential oils (LISTERINE®) to improve oral health: A Systematic Review. *Saudi Dent J.* 2018;30(1):2-6.
8. Goes P, Dutra CS, Lisboa MR, Gondim DV, Leitão R, Brito GA, et al. Clinical efficacy of a 1% Matricaria chamomile L. mouthwash and 0.12% chlorhexidine for gingivitis control in patients undergoing orthodontic treatment with fixed appliances. *J Oral Sci.* 2016;58(4):569-74.
9. Pahwa N, Kumar A, Gupta S. Eficacia clínica a corto plazo de un enjuague bucal de cloruro de cetilpiridinio al 0,07% en pacientes sometidos a tratamiento con aparatos de ortodoncia fijos. *J Oral Sci.* 2018;40(2):320-32.
10. Herrera D, Escudero N, Pérez L, Otheo M, Cañete-Sánchez E, Pérez T Alonso. et al. Clinical and microbiological effects of the use of a cetylpyridinium chloride dentifrice and mouth rinse in orthodontic patients: a 3-month randomized clinical trial. *Eur J Orthod.* 2018;40(5):465-74.

11. Becker K, Brunello G, Scotti L, Drescher D, John G. Efficacy of 0.05% Chlorhexidine and 0.05% Cetylpyridinium Chloride Mouthwash to Eliminate Living Bacteria on In Situ Collected Biofilms: An In Vitro Study. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(6):730.
12. Admakin O, Khakimova D, Solop I. Prevalence white spot lesions (wsl) in patients with fixed orthodontic appliances. *Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018,05(05),4640-4.
13. Leeper DK, Noureldin A, Julien K, Campbell PM, Buschang PH. Risk assessments in orthodontic patients developing white spot lesions. *J Investig Clin Dent*. 2019;10(4):e12470.
14. Hassan S, Nimmi B, Abraham B. et al. Antimicrobial efficacy of salvadora of salvadora pérsica extracts on a monospecies biofilm on orthodontic Brackets invitro. *Oral Health Prev Dent*. 2016;14(2):149-55.
15. Grönroos L, Alaluusua S. Site-Specific Oral Colonization of Mutans Streptococci Detected by Arbitrarily Primed PCR Fingerprinting. *Caries Res*. 2000;34:474-80.
16. Kalpavriksha AJ, Siddaiah SB, Bilichodmath S, Prabhakara S, Rao HH. Comparative Evaluation of Antibacterial Effect of GIC Containing Chlorhexidine and Miswak on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Early Childhood Caries Children: A PCR Study. *Int J Clin Pediatr Dent*. 2021;14(2):229-34.
17. Leelarungsang S, Chakrapan P, Ayudhya N. et al. Inhibition of Biofilm Formation from *Streptococcus mutans* by Mouthwashes in Vitro. *International Journal of Medical Science and Current Research*. 2021;4:1037-42.
18. Ardizzoni A, Pericolini E, Paulone S, Orsi CF, Castagnoli A, Oliva I, Strozzi E. et al. In vitro effects of commercial mouthwashes on several virulence traits of *Candida albicans*, *viridans streptococci* and *Enterococcus faecalis* colonizing the oral cavity. *PLoS One*. 2018;13(11).
19. Braga AS, Girotti LD, de Melo Simas LL, Pires JG, Pelá VT, Buzalaf MAR. et al. Effect of commercial herbal toothpastes and mouth rinses on the prevention of enamel demineralization using a microcosm biofilm model. *Biofouling*. 2019;35(7):796-804.
20. Eltayeb MK, Ibrahim YE, El Karim IA, Sanhoury NM. Distribution of white spot lesions among orthodontic patients attending teaching institutes in Khartoum. *BMC Oral Health*. 2017;17(1):88.
21. Ali A, Ismail H, Amin K. Effect of nanosilver mouthwash on prevention of white spot lesions in patients undergoing fixed orthodontic treatment - a randomized double-blind clinical trial. *J Dent Sci*. 2022;17(1):249-55.

22. Lacerda MÂ, Junqueira JC, Uchoa AF, Bresciani E, Rastelli NA, Navarro RS. et al. Photodynamic inactivation of planktonic cultures and *Streptococcus mutans* biofilms for prevention of white spot lesions during orthodontic treatment: An in vitro investigation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2019;155(2):243-53.
23. Beerens MW, Ten Cate JM, van der Veen MH. Microbial profile of dental plaque associated to white spot lesions in orthodontic patients immediately after the bracket removal. *Arch Oral Biol.* 2017;78:88-93.
24. Wang C, van der Mei HC, Busscher HJ, Ren Y. *Streptococcus mutans* adhesion force sensing in multi-species oral biofilms. *NPJ Biofilms Microbiomes.* 2020;24;6(1):25.
25. Schneider BJ, Hiers RD, Currier GF, Kadioglu O, Johnston SE, Zhao YD. et al. Assessment of *Streptococcus mutans* biofilms on orthodontic adhesives over 7 days. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2021;160(1):50-7.
26. Millones-Gómez PA, Maurtua-Torres D, Bacilio-Amaranto R, Calla-Poma RD, Requena-Mendizabal MF, Valderrama-Negron AC, Calderon-Miranda. Antimicrobial Activity and Antiadherent Effect of Peruvian *Psidium guajava* (Guava) Leaves on a Cariogenic Biofilm Model. *J Contemp Dent Pract.* 2020;21(7):733-40.
27. Gómez PAM, Mendizábal MFR, Poma RDC, Cifuentes TVR, Quispe FMM, Torres DJM. Antibacterial and antiadhesion effects of *Psidium guajava* fractions on a multispecies biofilm associated with periodontitis. *Pesqui Bras Odontopediatria Clín Integr.* 2022; 22:e210080.
28. Nafarrate-Valdez RA, Martínez-Martínez RE, Zaragoza-Contreras EA, Áyala-Herrera JL, Domínguez-Pérez RA, Reyes-López SY, et al. Anti-Adherence and Antimicrobial Activities of Silver Nanoparticles against Serotypes *C* and *K* of *Streptococcus mutans* on Orthodontic Appliances. *Medicina (Kaunas).* 2022;30;58(7):877.
29. Acero L, Padilla T, Mamani V, Centeno V. et al. Acción antibacteriana de colutorios de uso ortodóntico sobre *Streptococcus Mutans*. *Revista de Investigación en Salud.* Volumen 5 No.2022.
30. Araújo IJS, Carvalho MS, Oliveira TR, Puppim-Rontani RM, Höfling JF, Mattos-Graner RO, et al. Actividad antimicrobiana de los enjuagues bucales frente a bacterias que colonizan inicialmente la superficie dental. *Rev. Odontol UNESP.* 2019;48:e20180130.
31. Moein N, Alavi FN, Salari A, Mojtahedi A, Tajer A. Effect of listerine mouthwash with green tea on the inhibition of *streptococcus mutans*: a microbiologic study. *Pesqui Bras Odontopediatria Clín Integr.* 2020;20:e5477.

32. Da Silva NB, Alexandria AK, De Lima AL, Claudino LV, De Oliveira Carneiro TF, Da Costa AC. et al. In vitro antimicrobial activity of mouth washes and herbal products against dental biofilm-forming bacteria. *Contemp Clin Dent*. 2012;3(3):302-5.
33. Haerian-Ardakani A, Rezaei M, Talebi-Ardakani M, Keshavarz Valian N, Amid R, Meimandi M, Esmailnejad A. et al. Comparison of Antimicrobial Effects of Three Different Mouthwashes. *Iran J Public Health*. 2015;44(7):997-1003.
34. Chen Y, Wong RW, Seneviratne CJ, Hägg U, McGrath C, Samaranayake LP. Comparison of the antimicrobial activity of Listerine and Corsodyl on orthodontic brackets in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2011;140(4):537-42.
35. Barbosa I, Coury S, Collantes I. Can mouth washes containing chlorhexidine 0.12% be used as synonym of a water solution of chlorhexidine 0.12%. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 51;2015.
36. Tahmourespour A, Aminzadeh A, Salehifard I. Anti-adherence and anti-bacterial activities of *Pistacia atlantica* resin extract against strongly adherent *Streptococcus mutans* strains. *Dent Res J (Isfahan)*. 2022;19:36.

## **Anexos**

## Anexo N°01: Resolución del Comité de Ética



**CONSEJO DE FACULTAD**  
**RESOLUCIÓN N° 087-2022-USAT-FMED**  
 Chiclayo, 10 de junio de 2022

Vista la solicitud virtual N° TRL-2021-19935 en virtud de la aprobación con fecha 07 de junio de 2022 por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina del Proyecto de Investigación de la estudiante DIAZ CABRERA VALERIA TERESA, de la Escuela de Odontología. Asesor: Mgtr. Mariano Wenceslao Ortiz Pizarro.

**CONSIDERANDO:**

Que esta investigación forma parte de las áreas y líneas de investigación de la Escuela de Odontología.

Que el proyecto de Investigación denominado: **EFFECTO DE TRES ENJUAGUES ORALES COMERCIALES SOBRE LA ADHERENCIA DE UN MODELO DE BIOFILM IN VITRO DE STREPTOCOCCUS MUTANS Y STREPTOCOCCUS GORDONII**, fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Medicina.

En uso de las atribuciones conferidas por la Ley Universitaria N° 30220 y el Estatuto de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo;


**SE RESUELVE:**

Artículo 1º.- Declarar aprobado el Proyecto de Investigación para continuar con el proceso de recolección de datos y finalización del mismo.

Artículo 2º.- Dar a conocer la presente resolución a la interesada.

Regístrese, comuníquese y archívese.



  
**Mgtr. Nelly Patricia Becerra Escate**  
 Secretaria Académica  
 Facultad de Medicina



  
**Mtro. Luis Enrique Jara Romero**  
 Decano (e)  
 Facultad de Medicina

Anexo N° 02: Resolución de laboratorio de bacteriología de la Universidad Cayetano Heredia.



**UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA  
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFIA  
LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA**

**Proforma No. MBB001-02-2022**

Solicitante:  
Srta. Valeria Teresa Díaz Cabrera  
Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo

Fecha de solicitud: 01/ 02/ 2022

| Numero de muestra       | Tipo de análisis   | Costo por unidad soles (S/). | Costo total soles (S/). |
|-------------------------|--|------------------------------|-------------------------|
| 4 Enjuagatorios bucales | - Enfrentamiento de Enjuagatorios bucales a biofilm microbiano de 2 bacterias microaerofilas | 240                          | 960                     |
|                         | % IGV  |                              | 172.80                  |
| <b>TOTAL</b>            |  |                              | <b>1132.80</b>          |

En el total está incluido el % IGV

- En la presente proforma no se encuentra incluido el costo de toma y/o transporte de la muestra.
- **Boleta de Pago:** Cancelar en la tienda virtual de la UPCH al código número:
- **Requerimiento de Factura:** Cancelar la totalidad a la cuenta N° 151-0657346-057 del Banco de Crédito del Perú, por concepto de análisis y escanear el Boucher con los datos de la empresa (RUC, razón social, dirección) para la emisión de la factura correspondiente.

Para la realización de las tomas de muestras o análisis, comunicarse con el laboratorio con **72 horas de anticipación**. El tiempo del procesamiento de la muestra para la emisión de resultados es de 2 meses de recibido la muestra.

Lima, 11 de Febrero del 2022

  
 MSC. Dora Maurtua Torres  
 Microbióloga – CBP 776  
 Laboratorio de Bacteriología  
 Telf. 3190000 – 233243  
 Celular: 98933-4853



Dirección: Av. Honorio Delgado 430 – Urbanización Ingeniería. San Martín de Porres

## Anexo 03: Operacionalización

| <b>VARIABLE</b>                             | <b>DEFINICIÓN<br/>CONCEPTUAL</b>  | <b>DEFINICIÓN<br/>OPERACIONAL</b>              | <b>INDICADORES</b>                 | <b>VALORES</b>  | <b>TIPO DE<br/>VARIABLE</b> | <b>ESCALA<br/>DE<br/>MEDICIÓN</b> |
|---|---|--|------------------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------------|
| <b>ENJUAGUES<br/>ORALES<br/>COMERCIALES</b> | Sustancia farmacéutica tipo solución acuosa usada para el tratamiento tópico de afecciones bucales <sup>(9)</sup> .         | Tipos de enjuagues orales evaluados invitro.   | Nombre del producto comercial      | -Vitis orthodontic®<br>-Colgate Periogard®<br>-<br>LISTERINE®<br>Anti-Sarro<br>Zero Alcohol | Cualitativa                 | Nominal                           |
| <b>ADHERENCIA<br/>BACTERIANA</b>            | Es la interrelación que se establece entre los microorganismos y los tejidos del hospedador, lo que permite la colonización | Según protocolo establecido en la metodología. | Absorbancia por espectrofotometría | Densidad óptica (D.O.)  | Cuantitativa                | Razón                             |

|                                   |  |   |                    |                 |              |       |
|-----------------------------------|--|---|--------------------|-----------------|--------------|-------|
|                                   | Microbiana. <sup>(14)</sup>  |   |                    |                 |              |       |
| <b>EFFECTO<br/>ANTIBACTERIANO</b> | Capacidad que presentan algunas sustancias químicas o biológicas de impedir el desarrollo de bacterias de forma temporal o permanente. <sup>(17)</sup> | Según protocolo establecido en la metodología | Halo de inhibición | Milímetros (mm) | Cuantitativa | Razón |

## Anexo 04: Matriz de Consistencia

| Título del proyecto   | Formulación del problema   | Hipótesis  | Objetivos   | Variables  | Metodología   | Unidad de análisis   |
|---|--|--|---|--|---|--|
| Efecto de tres enjuagues orales comerciales sobre la adherencia de un modelo de biofilm <i>invitro</i> de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus gordonii</i> . | ¿Cuál es el efecto de tres enjuagues orales comerciales sobre la adherencia bacteriana de un modelo de biofilm <i>invitro</i> de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus gordonii</i> ? | El efecto antiadherente de tres enjuagues orales comerciales sobre el modelo de biofilm de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus gordonii</i> , es diferente. | <p><b>OBJETIVOS GENERAL</b></p> <p>Evaluar el efecto de tres enjuagues orales comerciales sobre la adherencia bacteriana de un modelo de biofilm <i>invitro</i> de <i>Streptococcus mutans</i> y <i>Streptococcus gordonii</i></p> <p><b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b></p> <p>Evaluar el efecto antibacteriano de enjuagues orales comerciales sobre <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 y <i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 51656</p> <p>Comparar el efecto antiadherente de tres enjuagues comerciales sobre un biofilm oral <i>In Vitro</i> de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175<sup>TM</sup> y <i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 51656<sup>TM</sup></p> | <p><b>Efecto antibacteriano</b></p> <p><b>Adherencia bacteriana.</b></p> | <p>Basico</p> <p>Campo</p> <p>Transversal</p> <p>Prolectivo</p> <p>Prospectivo</p> <p>Experimental</p> <p>Explicativo</p> <p>Cuantitativa</p> | <p>Biofilm</p> <p>constituido por la cepa de <i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175 <i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 51656<sup>TM</sup>.</p> |